基础研究

低强度脉冲超声对环磷酰胺诱导的大鼠卵巢损伤有修复作用

唐华均,杨 欢,范艺巾,李成志
重庆医科大学生物医学工程学院//省部共建国家重点实验室培育基地—重庆市超声医学工程重点实验室//重庆市生物医学工程学重点实验室//重庆市微无创医学协同创新中心,重庆 400016

摘要:目的 探讨低强度脉冲超声对腹腔注射环磷酰胺引起的SD大鼠卵巢损伤的修复作用。**方法** 63只清洁级雌性SD大鼠随机取13只为正常组,其余50只连续5 d腹腔注射环磷酰胺30 mg/kg,建立卵巢早衰动物模型。将造模成功的43只大鼠随机分为实验对照组(21只)、治疗组(22只)。正常组、实验对照组不干预;治疗组给予低强度脉冲超声辐照。监测各组大鼠动情周期的变化,辐照结束后7 d处死大鼠,测定血清雌二醇(E_2),卵泡刺激素(FSH),抗苗勒管激素(AMH)的变化,观察各组大鼠卵巢形态学及卵泡数量变化。**结果** 注射环磷酰胺后,与正常组相比,实验对照组动情周期紊乱,各级卵泡数明显减少,血清E_2和AMH显著降低,FSH显著升高(P=0.01);超声辐照后,与实验对照组相比,治疗组动情周期恢复正常,卵泡数明显增加,血清E_2显著增高(P=0.01),FSH显著降低(P=0.01),AMH变化不明显(P=0.50)。**结论** 低强度脉冲超声对腹腔注射环磷酰胺引起的SD大鼠卵巢的损伤有修复作用。
关键词:低强度脉冲超声;环磷酰胺;卵巢损伤;卵巢早衰

Low-intensity pulsed ultrasound promotes repair of cyclophosphamide-induced ovarian injury in rats

TANG Huajun, YANG Huan, FAN Yijin, LI Chengzhi
State Key Laboratory of Ultrasound Engineering in Medicine Co-Founded by Chongqing and the Ministry of Science and Technology, College of Biomedical Engineering, Chongqing Key Laboratory of Biomedical Engineering, Chongqing Collaborative Innovation Center for Minimally-invasive and Noninvasive Medicine; Chongqing Medical University, Chongqing 40016, China

Abstract: Objective To study the effects of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in promoting repair of cyclophosphamide (CTX)-induced ovarian injury in female rats. **Methods** Fifty female SD rats were subjected to intraperitoneal injection of cyclophosphamide at 30 mg/kg for 5 consecutive days to induce premature ovarian failure. Successful modeling was achieved in 43 rats, which were then randomized into model group (21 rats) and treatment group (22 rats), with another 13 rats without any injections serving as the normal control group. The rats in the treatment group received low-intensity pulsed ultrasound treatment, and those in the other two groups received no interventions. The estrous cycle of the rats was monitored during the experiment, and all the rats were sacrificed 7 days after the treatment for analysis of serum estradiol (E_2), follicle stimulating hormone (FSH), anti-Mullerian hormone (AMH), morphological changes of the ovary and the number of follicles. **Results** Compared with those in the normal control group, the rats in the model group showed disorders in the estrous cycle, reduced number of follicles at all levels, significantly decreased serum E_2 and AMH, and increased serum FSH following CTX injection (P=0.01). Ultrasound treatment obviously promoted the recovery of estrous cycle, significantly increased the number of follicles and serum E_2 (P=0.01), and decreased FSH (P=0.01) in the rats with CTX-induced ovarian injury, but AMH showed no significant changes after ultrasound treatment (P=0.50). **Conclusion** Low-intensity pulsed ultrasound can promote the repair of the CTX-induced ovarian injury in SD rats.
Keywords: low-intensity pulsed ultrasound; cyclophosphamide; damage of ovarian function; premature ovarian failure

卵巢早衰(POF)是指女性在40岁以前由于卵巢内卵泡耗竭或医源性损伤导致的卵巢功能衰竭。主要的表现为月经紊乱(停经或月经稀发),潮热、盗汗等低雌激素症状以及不孕[1]。卵巢早衰占继发性闭经患者的4%~18%[2]。目前尚无治疗明确有效的方法来治疗POF,而主要采用激素替代治疗、促排卵治疗、赠卵辅助生殖等来改善POF患者症状[3]。其中运用最为广泛的激素替代治疗虽可迅速改善由低雌激素引起的绝经前期症状,但不能改善卵巢功能、促进卵泡发育和提高排卵率[4]。因此有必要寻求一种新的更为有效的治疗方法。

低强度脉冲超声(LIPUS)以脉冲为发射方式,传递给周围组织的能量低,可有效避免热效应对细胞的损伤作用,且其耐受性良好、操作可控、无辐射。早在1978年就有动物试验证明,小剂量超声波可以促进幼鼠卵巢滤泡形成,使子宫内膜蜕变周期提前[5]。近年也有研究发现[6]:LIPUS可以增强雌激素受体β蛋白的表达而促进围绝经期大鼠的卵泡发育。环磷酰胺可通过促进静止期卵泡增殖及加速生长期卵泡凋亡而使卵泡丢失最终导致POF[7]。目前运用环磷酰胺来诱导卵巢损伤的动物模型已较为成熟[8-10]。故本研究采用环磷酰胺来建立雌性SD大鼠卵巢损伤模型并采用低强度脉冲超声进行治疗,旨在观察LIPUS对SD大鼠卵巢功能的影响,探讨其对卵巢功能的修复作用,将为POF的临床研究及应用提供一些新的治疗目标和策略。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物　清洁级SD雌性大鼠,月龄12周,体质量200±20 g,购自重庆医科大学实验动物中心,SD大鼠饲养在23~25 ℃室内,光照12 h,自由饮食。适应性喂养7 d后,每天上午9:00-10:00对大鼠进行阴道涂片,连续观察14 d,筛选出63只连续出现两个规律动情周期的大鼠纳入实验。

1.1.2 主要试剂及仪器　环磷酰胺(CTX,粉剂,200 mg/支),实验时将120 mg CTX溶于12 mL生理盐水配制成10 mg/mL水溶液注射;碱性美蓝染液(自制,A液:亚甲基蓝0.6 g溶于30 mL 95%乙醇中;B液氢氧化钾0.01 g溶于100 mL蒸馏水中;待A、B液完全溶解后混合并搅拌均匀);低功率聚焦超声实验装置,重庆海扶医疗科技股份有限公司研制,超声频率0.5~1.2 MHz,Ⅰ~Ⅷ档连续可调,治疗头直径≤2 cm,脉冲波。

1.2 实验方法

1.2.1 阴道涂片法　将待检查的SD雌鼠置于饲养笼铁丝盖上,左手的中指、无名指和小指固定好大鼠,再用大拇指及食指拉住大鼠的尾巴,有粪便和尿液时应抖掉、擦净,右手持无菌棉签蘸取少量无菌生理盐水后轻轻插入大鼠阴道内并适当转动,取出后均匀涂抹在载玻片上。自然风干后,无水乙醇固定(3~5)min,流水冲洗2 min,待自然风干后再用碱性美蓝染液染色5 min,流水冲洗,自然风干后中性树脂封片后镜检。

1.2.2 大鼠卵巢早衰模型的制备　50只SD大鼠参考文献[10]的方法建立大鼠卵巢早衰的动物模型:腹腔注射环磷酰胺30 mg/kg,1次/d,持续5 d。从腹腔注药第1天开始,连续19 d,每天上午9:00-10:00进行大鼠阴道脱落细胞涂片检测发情周期,涂片出现持续动情间期表示建模成功,共造模成功43只大鼠。

1.2.3 分组及干预　将造模成功的43只大鼠随机分为2组,即实验对照组21只、治疗组22只。另13只为正常组。正常组、实验对照组:不予干预;治疗组:在实验前对大鼠进行阴道涂片,当涂片显示动情间期时开始低强度脉冲超声辐照。超声频率:900 kHz;声强:0.8 W/cm^2;脉冲间隔时间:2 s;辐照时间为30 min/d,共辐照10 d。从辐照第1天开始,连续17 d,每天上午9:00-10:00进行阴道涂片检测发情周期变化。

1.2.4 取材及处理方法　各组大鼠分别于治疗结束后7 d处死,留取血清,卵巢及子宫标本。处死大鼠前,禁食4 h并准确称取大鼠体质量,1%戊巴比妥按(0.3~0.5) mL/kg腹腔注射麻醉,麻醉后沿腹白线打开腹腔后从右侧卵囊内取出卵巢,小心分离周围脂肪组织后迅速将卵巢置于4%多聚甲醛中固定24 h,包埋蜡块用于制备组织切片。最后打开横隔,暴露心脏,于心尖搏动最明显处,用2.5 mL注射器取血,全血室温静置(1~2)h,离心机2000 r/min,4 ℃离心20 min,离心2次,取澄清上清液置于-20 ℃保存以检测相关指标。

1.3 观察指标

1.3.1 各组大鼠动情周期变化　从实验开始至实验结束,每天上午9:00-10:00对大鼠进行阴道脱落细胞涂片,观察各个大鼠动情周期的变化情况。

1.3.2 卵巢组织形态学及卵泡计数　卵巢组织经过常规石蜡包埋,连续切片,厚度4 μm,选取右侧卵巢最大剖面连续3张组织切片进行HE染色,切片光镜下观察卵巢组织形态学变化,参照大鼠各级卵泡分级标准[11]:光镜下(×40)分别计数各组具有正常卵泡结构的各级卵泡数(3张切片卵泡数相加)。

1.3.3 血清性激素检测　采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测。操作步骤严格按照E_2、FSH、AMH试剂盒说明书进行,在酶标包被板上加入待测血清样品与相应抗体37 ℃温育30 min,加酶标试剂37 ℃温育30 min,显色液显色,经终止液终止后迅速将样品放入酶标仪中测定吸光度。使用标准品绘制标准曲线。

1.4 统计学方法

应用SPSS 22.0软件进行统计学分析。计量资料,满足方差齐性和正态性,采用单因素方差分析,不满足方差齐心或正态性,采用非参数检验。多次重复测量数据采用重复测量资料方差分析。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠动情周期变化情况

给予环磷酰胺的50只大鼠,仅43只大鼠在给药后的2周内出现连续的动情间期,造模成功率为86%,说明短时间大剂量腹腔注射环磷酰胺能够建立卵巢早衰

动物模型。超声辐照结束后7 d,阴道细胞涂片显示22只(22/43,51.2%)大鼠动情周期恢复正常,其中治疗组22只(22/22,100%),试验对照组0只(0/21,0%)。

大鼠各个动情时期阴道涂片碱性美兰染色结果如下(1)动情前期:以椭圆形的有核上皮细胞为主,有核上皮细胞胞核呈深蓝色,胞浆呈浅蓝色(图1A);(2)动情期:以片状的、无核角质化上皮细胞为主,角化上皮细胞大多被染成深蓝色(图1B);(3)动情后期:片状角质化上皮细胞、有核上皮细胞和白细胞3种细胞均可见且比例相当(图1C);(4) 动情间期:以白细胞为主,白细胞体积小,多被染成深蓝色(图1D)。

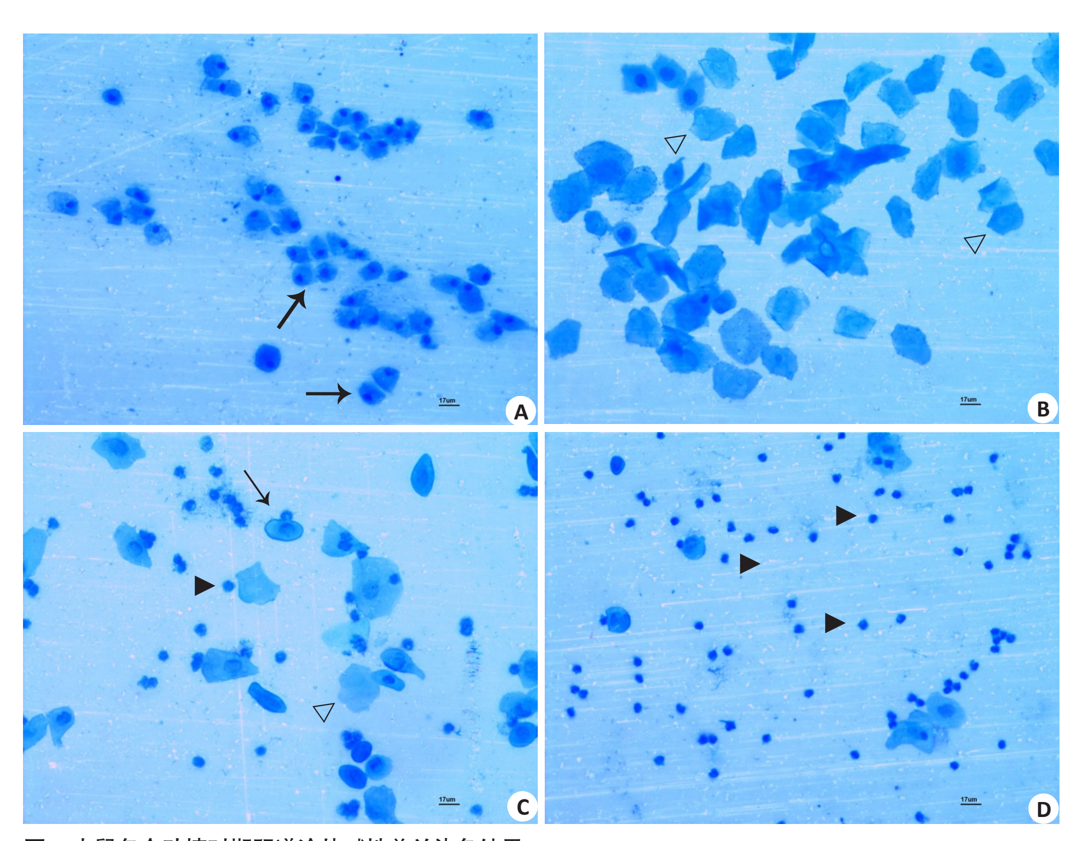


图1 大鼠各个动情时期阴道涂片碱性美兰染色结果

Fig.1 Results of vaginal smear examination (Alkaline meilan staining, original magnification: ×200). *A*: proestrus; *B*: estrus; *C*: metestrus; *D*: Diestrus. (→: Nucleated epithelial cells; ▲: Keratinocytes; △: leukocytes).

2.2 超声辐照后各组大鼠卵巢组织形态变化

超声辐照后卵巢组织病理学分析发现正常组卵巢体积大,卵泡生长活跃,可见各级卵泡,卵泡液含量丰富(图2A);与正常组相比,实验对照组卵巢体积萎缩,卵泡数量少且大多数为闭锁卵泡(图2B);与实验对照组相比,治疗组卵巢中可见较多生长卵泡,卵泡液多(图2C)。

2.3 超声辐照后各组大鼠卵泡计数比较

超声辐照后,与正常组相比,实验对照组的闭锁卵泡明显增多(P=0.00),其余各级卵泡明显减少(P均=0.00);与实验对照组相比,治疗组的闭锁卵泡明显减少(P=0.00),其余各级卵泡均有显著的增多(P均=0.00,表1)。

2.4 超声辐照后各组大鼠性激素水平变化

表2分析表明,与正常组相比,实验对照组大鼠血清E_2、AMH水平明显降低,FSH水平明显升高(P均=0.00);与实验对照组相比,治疗组大鼠血清E_2明显升高(P=0.00),FSH水平降低(P=0.00),但AMH水平无明显差异(P=0.50)。

3 讨论

环磷酰胺为细胞周期非特异性的烷化剂,其不仅对分裂增殖期细胞有毒性作用,而且对未发育的卵母细胞或原始卵泡中的前颗粒细胞也有毒性作用,最终可影响卵泡的发育[12]。此外,环磷酰胺还可通过增加卵巢组织中SDF-1/CXCR4的表达及颗粒细胞的凋亡来损伤卵巢功能[13-14]。本研究结果显示环磷酰胺能够扰乱性成熟的雌性SD大鼠的动情周期,降低雌激素的水平,并使大鼠卵巢组织中闭锁卵泡明显增多、其余各级卵泡数明显减少。这些结果均提示环磷酰胺能够引起大鼠的卵巢早衰,卵巢早衰的动物模型建立成功。

SD大鼠的动情周期包括动情前期,动情期,动情后期,动情间期4个阶段。它可间接反映卵巢功能的变

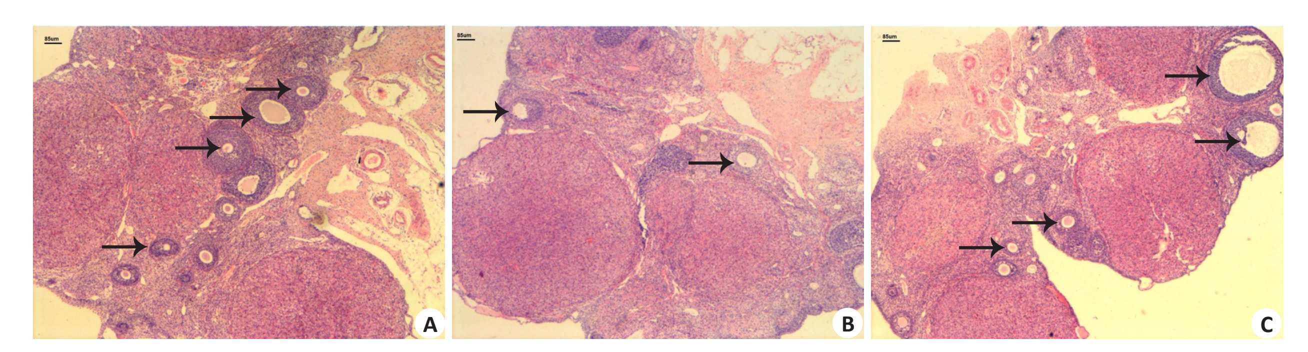


图2 超声辐照后各组大鼠卵巢病理学变化

Fig.2 Changes of ovarian pathology in the 3 groups of rats (×40). *A*: Normal group; *B*: Control group; *C*: Treatment group(→: Different levels of follicle).

表1 超声辐照后各组大鼠右侧卵巢卵泡计数比较

Tab.1 Number of follicles in the right ovary in the 3 groups (*Mean±SD*)

Group	*n*	Primitive follicles	Primary follicles	Secondary follicles	Mature follicles	Atresia follicles
Normal group	12	36.75±5.31$^{\triangle}$	11.50±5.40$^{\triangle}$	6.5±1.31$^{\triangle}$	3.58±1.56$^{\triangle}$	6.67±2.27$^{\triangle}$
Control group	15	18.60±3.60*	7.53±2.17*	1.67±1.18*	1.07±0.80*	15.00±3.25*
Treatment group	16	42.19±5.98*$^{\triangle}$	15.25±2.29*$^{\triangle}$	7.93±1.24*$^{\triangle}$	4.06±1.57$^{\triangle}$	8.5±2.29$^{\triangle}$

*P<0.05 *vs* Normal group; $^{\triangle}P$<0.05 *vs* Control group.

表2 超声辐照后各组大鼠E_2、FSH、AMH测定结果

Tab.2 Testing results of E_2, FSH, and AMH in the 3 groups (ng/L, *Mean±SD*)

Group	*n*	E_2	FSH	AMH
Normal group	11	50.11±5.39$^{\triangle}$	2.16±0.58$^{\triangle}$	81.22±5.43$^{\triangle}$
Control group	17	20.02±4.38*	4.94±0.66*	48.24±4.56*
Treatment group	20	49.62±3.22$^{\triangle}$	2.03±1.49$^{\triangle}$	49.38±5.27*

*P<0.05 *vs* Normal group; $^{\triangle}P$<0.05 *vs* Control group.

化。我们的研究发现，与正常组13只大鼠相比，50只大鼠给予环磷酰胺药物后，43只大鼠出现持续动情间期(43/50，86%)，无动情期。这显示大鼠的动情周期被化疗药物环磷酰胺所扰乱，也提示了大鼠的卵巢功能被破坏。表明环磷酰胺药物损伤了卵巢功能。

雌二醇主要由卵巢卵泡细胞分泌的一种类固醇激素。雌二醇可以促进卵巢卵泡的生长和发育，子宫内膜增厚和腺体增多等。雌二醇的含量降低意味着卵巢分泌雌激素的功能降低[15-16]。卵泡刺激素(FSH)是由垂体前叶嗜碱性细胞分泌的一种糖蛋白激素，可刺激卵泡生长并参与卵泡的募集，它的升高意味着卵巢功能的减退[17]。抗苗勒管激素(AMH)主要是由卵巢的初级卵泡或早期窦状卵泡的颗粒细胞所分泌的二聚糖蛋白激素[18-19]。AMH不随月经周期的变化而波动，其值越低，卵巢储备功能越差[20-22]。本研究发现，建模成功后大鼠血清E_2、AMH水平明显下降，FSH水平明显升高，与临床上POF患者的血清学表现相似。

卵巢组织形态观察及卵泡计数结果显示，注射环磷酰胺后与正常组相比，实验对照组大鼠卵巢的闭锁卵泡明显增多、其余各级卵泡数明显减少。这与POF患者卵巢中卵泡丢失，闭锁增多等表现相符。

LIPUS目前已被应用于多个研究领域，如骨折后的愈合、关节软组织的损伤后修复等，疗效肯定[23]。此外，LIPUS还可以加快慢性炎症过程的消失，提高慢性缺血性肌肉的血液循环，促进神经传导阻滞的恢复，皮肤血管生成及韧带、肌腱的愈合[24-25]。本研究采用了强度为0.8 w/cm^{2}脉冲超声波对POF大鼠卵巢进行辐照，且辐照后，大鼠体重明显增加，局部皮肤及周围组织无损伤，卵巢各级卵泡数目明显增多，血清E_2水平明显升高、FSH水平明显下降，均说明低强度脉冲超声可以安全有效地促进POF大鼠卵巢功能恢复。

综上所述，低强度脉冲超声辐照对腹腔注射环磷酰胺引起的SD大鼠卵巢的损伤有明显的修复作用，能有效改善卵巢功能，但修复的作用机制有待于进一步研究。

参考文献：

[1] Podfigurna-Stopa A, Czyzyk A, Grymowicz M, et al. Premature ovarian insufficiency: the context of long-term effects [J]. J Endocrinol Invest, 2016, 39(9): 983-90.

[2] 周 莉, 高 婧, 陈 晨. 卵巢早衰的基因学研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 3(24): 1-3.

[3] Maclaran K, Panay N. Current concepts in premature ovarian insufficiency[J]. Womens Health (Lond Engl), 2015, 11(2): 169-82.
[4] Kou MJ, Ding XF, Chen JX, et al. Traditional Chinese Medicine Combined with Hormone Therapy to Treat Premature Ovarian Failure: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2016, 13(5): 160-9.
[5] Terhaar GR, Dyson M, Talbert D. Ultrasonically induced contractions in mouse uterine smooth muscle *in vivo*[J]. Ultrasonics, 1978, 16 (6): 275-9.
[6] 翟 蓓, 方廖琼, 李成志, 等. 低强度脉冲超声波对围绝经期大鼠卵巢功能的影响[J]. 中国超声医学杂志, 2012, 28(3): 207-10.
[7] Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, et al. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility [J]. Sci Transl Med, 2013, 5(185): 185ra62.
[8] Song D, Zhong Y, Qian C, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells therapy in Cyclophosphamide-Induced premature ovarian failure rat model[J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 2517514.
[9] Gabr H, Rateb MA, El Sissy MH, et al. The effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on chemotherapy induced ovarian failure in albino rats[J]. Microsc Res Tech, 2016, 79(10): 938-47.
[10] 张毅敏, 于 斌, 陈 佳, 等. 针刺治疗对卵巢早衰大鼠PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响[J]. 中国针灸, 2015, 35(1): 53-8.
[11] Akdemir A, Zeybek B, Akman L, et al. Granulocyte-colony stimulating factor decreases the extent of ovarian damage caused by cisplatin in an experimental rat model[J]. J Gynecol Oncol, 2014, 25 (4): 328-33.
[12] 周林燕, 张清学. 化疗对卵巢储备功能的影响及相关防治的研究进展[J]. 国际生殖健康计划生育杂志, 2016, 35(6): 493-7.
[13] Luo Q, Yin N, Zhang L, et al. Role of SDF-1/CXCR4 and cytokines in the development of ovary injury in chemotherapy drug induced premature ovarian failure mice[J]. Life Sci, 2017, 179: 103-9.
[14] Jiang Y, Zhao J, Qi HJ, et al. Accelerated ovarian aging in mice by treatment of busulfan and cyclophosphamide[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2013, 14(4): 318-24.
[15] 吕晓丹, 李 莹, 张 璐, 等. 化疗药物致卵巢损伤的表型分析及可能机制[J]. 生殖医学杂志, 2016, 25(6): 540-4.
[16] Miyazaki K, Miki F, Uchida S, et al. Serum estradiol level during withdrawal bleeding as a predictive factor for intermittent ovarian function in women with primary ovarian insufficiency[J]. Endocr J, 2015, 62(1): 93-9.
[17] Luisi S, Florio P, Reis FM, et al. Inhibins in female and male reproductive physiology: role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy[J]. Hum Reprod Update, 2005, 11 (2): 123-35.
[18] 钱警语, 陈秀娟. 抗苗勒管激素与女性生育功能关系研究进展[J]. 生殖与避孕, 2013, 33(7): 473-8, 495.
[19] Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, et al. Anti-Mü llerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment[J]. Mol Hum Reprod, 2004,10 (2): 77-83.
[20] Kruszyńska A, Słowińska-Srzednicka J. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a good predictor of time of menopause [J]. Prz Menopauzalny, 2017, 16(2): 47-50.
[21] Krawczuk-Rybak M, Leszczynska E, et al. Anti-müllerian hormone as a sensitive marker of ovarian function in young cancer survivors [J]. Int J Endocrinol, 2013, 2013: 125080.
[22] Visser JA, Schipper I, Laven JS, et al. Anti-Müllerian hormone: an ovarian reserve marker in primary ovarian insufficiency [J]. Nat Rev Endocrinol, 2012, 8(6): 331-41.
[23] Imai Y, Hasegawa T, Takeda D, et al. The osteogenic activity of human mandibular fracture haematoma-derived cells is stimulated by low-intensity pulsed ultrasound *in vitro*[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2014, 43(3): 367-72.
[24] Chen MH, Sun JS, Liao SY, et al. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates matrix metabolism of human annulus fibrosus cells mediated by transforming growth factor β1 and extracellular signal-regulated kinase pathway[J]. Connect Tissue Res, 2015, 56(3): 219-27.
[25] Omes C, Fassina L, Maqenes G, et al. Biological effects of ultrasound stimulus on cells derived from human ovarian follicular liquid[J]. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2013, 2013: 850-3.